



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 079**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03024982 .5**

96 Fecha de presentación : **29.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1416279**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico del cáncer pancreático y composiciones útiles en los mismos.**

30 Prioridad: **31.10.2002 EP 02024539**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Buchholz, Malte;**
Gress, Thomas;
Loesch, Stephanie y
Weidle, Ulrich

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 318 079 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para el diagnóstico del cáncer pancreático y composiciones útiles en los mismos.

5 La invención está relacionada con el diagnóstico específico del cáncer pancreático.

El cáncer pancreático es un tipo de cáncer que es difícil de diagnosticar y de controlar, y la mayoría de estos cánceres pueden crecer muy rápidamente.

10 Las neoplasias de páncreas exocrino pueden surgir a partir de células ductales, acinares o del estroma. El 80% de los carcinomas pancreáticos derivan del epitelio ductal. El 60% de estos tumores están localizados en la cabeza del páncreas, el 10% en la cola y el 30% están localizados en el cuerpo del páncreas o son difusos ((Warshaw, A.L., y Fernandez-del, C.C., N. Engl. J. Med. 326 (1992) 4555-4565). Histológicamente, estos tumores se clasifican además en diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Algunos tumores se clasifican como
15 adenoescamosos, mucinosos, indiferenciados o indiferenciados con células gigantes tipo osteoblasto (Gibson, J.B., y Sobin, L.H., Histological typing of tumors, of the liver, biliary tract and pancreas, WHO, Geneva, 1978). Puesto que la enfermedad es asintomática en sus fases tempranas, y a causa de la falta de alguna prueba de diagnóstico precoz y a su carácter agresivo respecto a la metástasis local y en órganos viscerales, esta enfermedad se asocia con muy mal pronóstico. Sólo el 20% de los tumores son extirpables y la mejora en la supervivencia de los regímenes
20 quimioterapéuticos aprobados es bastante pobre (Kroep, J.R., *et al.*, Ann. Oncol. 10, Supl. 4 (1999) 234-238). La identificación de nuevas dianas para el diagnóstico precoz de los tumores pancreáticos es por lo tanto un reto de suma importancia.

La WO 02/08288 describe unos polipéptidos secretados y transmembranales, y los ácidos nucleicos que los codifican. La Fig. 130 muestra la secuencia polipeptídica de UKW.

Resumen de la invención

30 Sorprendentemente se encontró que los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido UKW están sobreexpresados específicamente en las células tumorales pancreáticas, mientras que la expresión es considerablemente menor en las células pancreáticas normales o en células tumorales de otro origen, por ejemplo, células de cáncer de pulmón o de cáncer de colon. Por lo tanto, UKW es una nueva diana valiosa para el diagnóstico específico.

La presente invención por lo tanto proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de cáncer
35 pancreático en un paciente, que comprende

(i) obtener una muestra biológica del paciente

40 (ii) detectar en la muestra una cantidad de ácido nucleico que codifica UKW o una cantidad de polipéptido UKW; y

(iii) comparar la cantidad de ácido nucleico o polipéptido con un valor estándar predeterminado que indique la línea de decisión entre expresión de UKW inducida por un tumor o no inducida por un tumor o la presencia en la célula, y a partir de ello determinar la presencia o ausencia de cáncer pancreático en el paciente.

45 Preferiblemente, la detección se realiza mediante la utilización de un agente de unión que se une al ácido nucleico o al polipéptido UKW. Más preferiblemente, el agente de unión es una sonda que hibrida bajo condiciones astringentes con el ácido nucleico de UKW, o un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido UKW, preferiblemente al dominio extracelular.

50 Además, la presente invención proporciona un proceso para determinar si una muestra de tejido o fluido de un paciente contiene o no células tumorales pancreáticas o deriva de células tumorales pancreáticas, en el que se usa la muestra de prueba y una segunda muestra que tiene su origen en células no tumorales pancreáticas del mismo individuo o un individuo diferente de la misma especie, y que comprende los siguientes pasos:

55 (a) incubar cada muestra respectiva bajo condiciones de hibridación restrictivas con una sonda de ácido nucleico que se selecciona de entre el grupo que consta de:

(i) una secuencia de ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1, o un fragmento de la misma;

60 (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a cualquier secuencia de ácido nucleico de (i);

(iii) una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones astringentes con la secuencia de (i); y

65 (iv) una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones astringentes con la secuencia de (ii); y

(b) determinar la cantidad aproximada de hibridación de cada muestra respectiva con dicha sonda, y

(c) comparar la cantidad aproximada de hibridación de la muestra de prueba con la cantidad aproximada de hibridación de dicha segunda muestra para identificar si la muestra contiene o no una cantidad mayor del ácido nucleico específico o mezcla de ácidos nucleicos que dicha segunda muestra.

5 La invención también incluye un método para la detección de tumores pancreáticos, que comprende

(a) incubar una muestra de un paciente que se sospecha que padece cáncer pancreático, seleccionada de entre el grupo de fluidos corporales, células, de un extracto celular o de sobrenadantes de cultivos celulares de dichas células, en la que dicha muestra contiene ácidos nucleicos, con una sonda de ácido nucleico que se selecciona del grupo que
10 consiste en

(i) el ácido nucleico mostrado en Id. de Sec. N°: 1 o un ácido nucleico que es complementario a dicha secuencia, y

15 (ii) ácidos nucleicos que hibridan con uno de los ácidos nucleicos de (i) y

(b) detectar la hibridación; preferiblemente por medio de otra pareja de unión del ácido nucleico de la muestra y/o la sonda del ácido nucleico o por radiografía de rayos X.

20 Ambos métodos pueden realizarse también utilizando anticuerpos, detectándose el polipéptido UKW por la interacción entre el anticuerpo y el polipéptido.

La invención también proporciona un método para monitorizar la progresión del cáncer pancreático en el paciente. En tal método, la cantidad de ácido nucleico o polipéptido UKW en una muestra biológica (por ejemplo, fluidos corporales como sangre, lisados celulares o un transcrito reverso de una muestra de RNA) de un paciente que padece
25 cáncer pancreático se determina en al menos dos puntos diferentes en tiempo y se comparan. La información de la progresión de dicho cáncer pancreático se puede deducir por el cambio de la cantidad.

La invención también proporciona equipos de diagnóstico que comprenden una o más sondas o cebadores oligonucleótidos para la hibridación con el ácido nucleico de UKW en un ensayo diagnóstico utilizando una muestra obtenida de un paciente afectado o del que se sospecha que padece cáncer pancreático.
30

La invención también comprende la utilización de anticuerpos contra el polipéptido de UKW.

35 Descripción detallada de la invención

Como se utiliza aquí, el término “UKW” se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Id. de Sec. N°: 2; preferiblemente la secuencia de DNA y la secuencia de mRNA relacionado de Id. de Sec. N°: 1, además del polipéptido codificado por el Id. de Sec. N°: 2. Puesto que UKW es una proteína receptora transmembranal, el
40 polipéptido es de excepcional interés para el diagnóstico y es preferible como epítipo para los anticuerpos que se unen al dominio extracelular de los polipéptidos de UKW. Por lo tanto, se prefiere dirigir la muestra de ácido nucleico y las sondas a esa región, y especialmente a partes de la misma que poseen baja homología con otros genes y polipéptidos.

El receptor UKW es una proteína transmembranal compuesta de 373 aminoácidos con una secuencia señal de 18 aminoácidos. El receptor consiste en un dominio extracelular de 215 aminoácidos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 117 aminoácidos. Los dominios extracelulares exponen dos pliegues tipo C2 de inmunoglobulina compuestos de 93 aminoácidos y 72 aminoácidos.
45

La frase “ácido nucleico o polipéptido” usada a lo largo de esta solicitud se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que tiene una actividad UKW, que está sustancialmente libre del material celular, o del medio de cultivo cuando se produce por técnicas de DNA recombinante, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Tal ácido nucleico preferiblemente está libre de secuencias que en la naturaleza flanquean el ácido nucleico (por ejemplo las secuencias localizadas en los extremos 5’ y 3’ del ácido nucleico) en el organismo del que deriva el ácido nucleico.
50

Las “sondas y cebadores de ácidos nucleicos para UKW”, tal y como se utiliza aquí, se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos útiles para la detección de los ácidos nucleicos de UKW mediante métodos de hibridación. Las técnicas y condiciones de hibridación son bien conocidas para los expertos en la materia. Tales condiciones de hibridación son, por ejemplo, condiciones moderadamente astringentes, lo que incluye el lavado con una solución de 5 x SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mmol/l, pH 8,0, seguido de una hibridación a 50-60°C con 5 x SSC toda la noche, lavado a temperatura ambiente durante 40 minutos con 2 x SSC que contiene SDS al 0,1% y después un lavado con 0,1 x SSC, SDS al 0,1% a 50°C durante 40 min. con un cambio de solución nueva. También es posible utilizar temperaturas más elevadas para la hibridación (por ejemplo, 65-70°C) como condiciones de hibridación altamente astringentes. La sonda y los cebadores de ácido nucleico normalmente consisten en un segmento del ácido nucleico de
55 UKW de al menos unas 50 posiciones consecutivas, más preferiblemente de 200 a 300 nucleótidos. La optimización de las sondas y los cebadores puede realizarse de acuerdo con el estado de la materia. Existe un programa informático (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) que se usa generalmente para el diseño de tales sondas y cebadores.
60

Para una elevada selectividad es preferible utilizar condiciones de salinidad relativamente baja y/o alta temperatura, por ejemplo, una concentración de sal de alrededor de 0,02 mol/l a alrededor de 0,15 mol/l y temperaturas desde alrededor de 50°C a alrededor de 70°C.

Los polipéptidos de UKW pueden identificarse en ensayos de diagnóstico utilizando sondas y cebadores específicos. Normalmente tales métodos incluyen la amplificación de la secuencia diana en la muestra mediante métodos de amplificación tales como el método de PCR. La detección cuantitativa puede realizarse con técnicas de PCR, preferiblemente mediante el uso de la RT-PCR cuantitativa, utilizando por ejemplo el termociclador LightCycler® de Roche Diagnostics GmbH, DE.

En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico codificante de la muestra se amplifica antes de la prueba, por ejemplo mediante la conocida técnica de PCR. Normalmente se utiliza una sonda de ácido nucleico derivada (marcada) en el marco del diagnóstico por ácidos nucleicos. Esta sonda se pone en contacto con un DNA, RNA o RT-DNA desnaturalizado de la muestra que se une a un transportador y en ese proceso se seleccionan la temperatura, fuerza iónica, pH y otras condiciones del tampón dependiendo de la longitud y composición de la sonda de ácido nucleico y de la temperatura de fusión resultante del híbrido esperado, de forma que el DNA o RNA marcados pueden unirse a DNA o RNA homólogo (hibridación, véase también Wahl, G.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 3683-3687). Los transportadores apropiados son membranas o materiales transportadores basados en la nitrocelulosa (por ejemplo, Schleicher y Schüll, BA 85, Amersham Hybond, C.), nitrocelulosa reforzada o unida en forma de polvo, o membranas de nailon modificadas con varios grupos funcionales (por ejemplo, grupos nitro) (por ejemplo, Schleicher y Schüll, Nytran; NEN, Gene Screen; Amersham Hybond M.; Pall Biodyne).

Para determinar si una muestra contiene células tumorales pancreáticas, se determina la cantidad aproximada de hibridación del ácido nucleico con el ácido nucleico o ácidos nucleicos diana. No es necesario determinar cuantitativamente la cantidad aproximada de hibridación, aunque se incluye una determinación cuantitativa en la presente invención. Típicamente, la cantidad aproximada de hibridación se determina cualitativamente, por ejemplo, mediante una inspección ocular tras la detección de la hibridación. Por ejemplo, si se usa un gel para diferenciar el ácido nucleico marcado que hibrida con el ácido nucleico diana en la muestra, la banda resultante puede examinarse visualmente. Cuando se realiza una hibridación del ácido nucleico aislado que está libre de células tumorales pancreáticas de un individuo de la misma especie, se sigue el mismo protocolo. Se puede comparar la cantidad aproximada de hibridación en la muestra con la cantidad aproximada de hibridación en la muestra libre de células tumorales pancreáticas, para identificar si la muestra contiene o no una cantidad mayor de ácido nucleico o ácidos nucleicos diana que una muestra que está libre de células tumorales pancreáticas.

En otro método de acuerdo con la invención no se utiliza una segunda muestra. Para detectar si el gen UKW está sobreexpresado, se compara el nivel de mRNA de UKW con el nivel de RNA de un gen estándar (gen de mantenimiento de la célula (ver, por ejemplo, Shaper; N.L., *et al.*, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 3 (1998) 315-324; Wu, Y.Y., y Rees, J.L., Acta Derm. Venereol. 80 (2000) 2-3), preferiblemente mediante RT-PCR.

Como se ha demostrado de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de UKW se expresa en mayor cantidad en una muestra tumoral pancreática que en una muestra libre de células tumorales pancreáticas y/o en una cantidad mayor que un gen de mantenimiento. Una muestra de prueba que contenga células tumorales pancreáticas tendrá una cantidad mayor de ácido nucleico de UKW que una muestra que está libre de células tumorales pancreáticas. Para identificar si una muestra de prueba contiene el ácido nucleico de UKW sobreexpresado, es decir, cuando las células son células tumorales pancreáticas o son células tumorales de un carcinoma mamario, es preferible que la muestra de prueba tenga una cantidad aproximada de ácido nucleico de UKW que sea notablemente superior a la cantidad aproximada en una muestra libre de células tumorales pancreáticas. Por ejemplo, una muestra de prueba que tenga un gen UKW sobreexpresado puede contener una cantidad del gen UKW entre aproximadamente 15 y aproximadamente 60 veces superior a la de una muestra libre de células tumorales pancreáticas, o al menos una cantidad tres veces superior del mRNA de UKW que de un mRNA de un gen de mantenimiento como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o la porfobilinógeno desaminasa.

Los expertos en la materia conocen los métodos de hibridación de una sonda y un ácido nucleico y se describen, por ejemplo, en la WO 89/06698, EP-A 0 200 362, US 2.915.082, EP-A 0 063 879, EP-A 0173 251, EP-A 0128 018.

El DNA o RNA hibridado se detecta entonces mediante la incubación del transportador con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tras lavados y una saturación exhaustivos para prevenir uniones inespecíficas. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son dirigidos hacia la sustancia incorporada en la sonda de ácido nucleico durante la hibridación. El anticuerpo está a su vez marcado. Sin embargo, también es posible usar DNA marcado directamente. Después de la incubación con los anticuerpos se lava de nuevo para detectar sólo los conjugados de anticuerpo unidos específicamente. La determinación se lleva a cabo entonces de acuerdo con los métodos conocidos, mediante el marcaje del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo.

La detección de la expresión puede llevarse a cabo por ejemplo mediante:

hibridación *in situ* con células completas fijadas, con frotis de tejido fijados,

- hibridación de una colonia (células) e hibridación de calvas (fagos y virus).

ES 2 318 079 T3

- hibridación Southern (detección de DNA),
- hibridación Northern (detección de RNA),
- 5 - análisis del suero (por ejemplo, análisis del tipo celular de las células del suero mediante análisis de slot-blot),
- posterior amplificación (por ejemplo, técnica de PCR).

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención son por lo tanto valiosos marcadores en el diagnóstico y caracterización de tumores pancreáticos.

De acuerdo con la invención los inhibidores de la expresión de UKW (por ejemplo, anticuerpos o nucleótidos antisentido) pueden utilizarse para inhibir la progresión de un tumor pancreático *in vivo*.

La invención también proporciona métodos para la identificación y aislamiento de antagonistas de UKW o inhibidores de la expresión de UKW (por ejemplo, anticuerpos o nucleótidos antisentido). Tales antagonistas o inhibidores pueden utilizarse para inhibir la progresión de un tumor pancreático y causar una apoptosis masiva de las células tumorales pancreáticas *in vivo*.

De acuerdo con la invención, se proporcionan métodos para la identificación y aislamiento de antagonistas de UKW que tienen utilidad en el tratamiento del cáncer. Esos métodos incluyen los métodos para modular la expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención, métodos para identificar los antagonistas de UKW que pueden unirse selectivamente a la proteína de acuerdo con la invención, y métodos de identificación de antagonistas de UKW que pueden modular la actividad de dichos polipéptidos. Los métodos también incluyen los métodos para modular, preferiblemente inhibir, la transcripción del gen UKW a RNAm. Esos métodos pueden realizarse *in vitro* o *in vivo* y pueden utilizar líneas celulares establecidas y los modelos de animales transgénicos de la invención.

Un antagonista de UKW se define como una sustancia o compuesto que disminuye o inhibe la actividad biológica de UKW o un polipéptido, y/o inhibe la transcripción o traducción del gen UKW. En general, los procedimientos de cribado de antagonistas de UKW implican poner en contacto las sustancias candidatas con células huésped en las cuales la capacidad invasiva es mediada por la expresión de UKW, bajo condiciones favorables para medir la actividad de UKW.

La actividad de UKW puede medirse de varias formas. Típicamente, la activación es aparente por un cambio en la fisiología celular, como una movilidad y capacidad invasiva aumentada *in vitro*, por un cambio en el estado de diferenciación, o por un cambio en el metabolismo celular que conduce a un aumento de la proliferación.

Los polipéptidos de UKW pueden obtenerse por métodos recombinantes o de forma sintética. Cuando se produce de forma recombinante en procariontes, se obtiene un polipéptido de UKW no glucosilado. Con ayuda de las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en la invención es posible buscar el gen UKW o sus variantes en el genoma de cualquier célula deseada (por ejemplo, además de en células humanas, en células de otros mamíferos), para identificarlos y aislar el gen deseado que codifica las proteínas UKW. Tales procesos y las condiciones de hibridación apropiadas son conocidas para un experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, y Hames, B.D., Higgins, S.G., Nucleic Acid Hybridisation - A Practical Approach (1985) IRL Press, Oxford, England. En este caso los protocolos estándar descritos en estas publicaciones se usan normalmente para los experimentos.

Con la ayuda de tales ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de UKW, puede obtenerse el polipéptido de acuerdo con la invención de una manera reproducible y en grandes cantidades. Para la expresión en organismos procariontes y eucariotes, tales como células huésped procariontes o células huésped eucariotes, el ácido nucleico se integra en los vectores de expresión apropiados, de acuerdo con métodos conocidos para un experto en la materia. Tal vector de expresión preferiblemente contiene un promotor regulable/inducible. Estos vectores recombinantes entonces se introducen para la expresión en células huésped adecuadas tales como, por ejemplo, *E. coli* como célula huésped procarionte o *Saccharomyces cerevisiae*, la línea celular de teratocarcinoma PA-1, sc 9117 (Biittner, R., *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 3573-3583), células de insecto o células CHO o COS como células huésped eucariotes, y las células huésped transformadas o transducidas se cultivan bajo condiciones que permiten la expresión del gen heterólogo. El aislamiento de la proteína puede llevarse a cabo según métodos conocidos a partir de la célula huésped o a partir del sobrenadante de cultivo de la célula huésped. Tales métodos se describen por ejemplo en Ausubel I., Frederick M., Current Protocols in Mol. Biol. (1992), John Wiley and Sons, New York. También puede ser necesaria una reactivación *in vitro* de la proteína si no se encuentra en forma soluble en el cultivo celular.

El polipéptido de UKW o los fragmentos del mismo pueden purificarse tras su producción recombinante mediante cromatografía de afinidad utilizando técnicas de purificación de proteínas conocidas, lo que incluye la inmunoprecipitación, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión, isoelectroenfoque, precipitación selectiva, electroforesis o similares, y pueden utilizarse para la generación de anticuerpos contra UKW.

La invención también comprende vectores de expresión recombinantes que son apropiados para la expresión de UKW, células huésped recombinantes transfectadas con tales vectores de expresión, así como un proceso para la producción recombinante de una proteína codificada por el gen UKW.

ES 2 318 079 T3

La invención también comprende un método de cribado para identificar un compuesto que inhibe la actividad biológica del polipéptido de UKW y que comprende:

5 poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto o una variedad de compuestos bajo condiciones que permiten la interacción de dicho compuesto con dicho polipéptido; y

detectar la interacción entre dicho compuesto o variedad de compuestos con dicho polipéptido.

10 La invención también comprende un método de cribado para identificar un compuesto que inhibe la actividad biológica del polipéptido de UKW o inhibe la transcripción o traducción del gen UKW, que comprende:

poner en contacto dicho compuesto o variedad de dichos compuestos con una célula huésped en la cual la capacidad invasiva está mediada por la expresión de UKW; y

15 detectar la interacción entre dicho compuesto o variedad de compuestos con dicha célula huésped.

La invención también comprende un método de cribado de acuerdo con la invención, en el que la detección de la interacción entre dicho compuesto o variedad de compuestos con dicha célula huésped se mide al menos por un cambio en la fisiología celular, un cambio en el estado de diferenciación, o un cambio en el metabolismo celular que conduce a un aumento de la proliferación.

20 La invención también comprende un método de cribado para la identificación de un compuesto que es un antagonista del polipéptido de UKW y que comprende:

25 poner en contacto dicho polipéptido de UKW con un compuesto bajo condiciones que permiten la interacción de dicho compuesto con dicho polipéptido;

determinar un primer nivel de actividad de dicho polipéptido;

30 determinar un segundo nivel de actividad de dicho polipéptido expresado en un huésped que no se ha puesto en contacto con dicho compuesto; y

relacionar cuantitativamente el primer nivel de actividad con el segundo nivel de actividad, y cuando dicho primer nivel de actividad es menor que dicho segundo nivel de actividad, dicho compuesto se identifica como un antagonista de dicho polipéptido.

35 Los anticuerpos contra UKW pueden producirse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales o policlonales utilizando un polipéptido de alrededor de 10 a 100 aminoácidos de la secuencia del polipéptido de UKW. Los polipéptidos apropiados derivados de UKW incluyen preferiblemente aminoácidos del dominio extracelular, preferiblemente los aminoácidos 70-80, 99-113, 120-140 y 167-182.

40 Los anticuerpos resultantes pueden cribarse por su capacidad de unirse a UKW utilizando técnicas estándar, tales como ensayos de inmunoabsorbentes acoplados a enzimas. Los métodos para identificar epítopos antigénicos y para la producción de anticuerpos se describen por ejemplo en Mole, "Epitope Mapping", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), págs. 105-116, The Humana Press, Inc., 1992; Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", en: *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter y Ladyman (Ed.), págs. 60-84, Cambridge University Press, 1995; Morris (Ed.), *Epitope Mapping Protocols* 25, Humane Press, Inc., 1996; y Coligan *et al.* (Ed.), *Current Protocols in Immunology*, págs. 9.3.1-9.3.5 y págs. 9.4.1-9.4.11, John Wiley & Sons, 1997.

50 Los anticuerpos que son útiles de acuerdo con la invención pueden identificarse porque reducen la proliferación y el potencial invasivo de las células tumorales pancreáticas. Con este propósito, se tratan las células tumorales pancreáticas o una línea celular de tumor pancreático, preferiblemente la línea celular SUT-2 007, con un anticuerpo contra UKW y se mide la proliferación y el potencial invasivo mediante el reactivo Cell Proliferation Reagent WST-1 (un reactivo de sal de tetrazolio, de Roche Diagnostics GmbH, DE) y el ensayo de invasión Matrigel (BDS Biosciences, www.bdbiosciences.com).

55 Los anticuerpos anti-UKW pueden derivarse de cualquier especie animal o ser anticuerpos quiméricos o humanizados. Son especialmente preferibles los anticuerpos humanos. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen, por ejemplo, a partir de ratones transgénicos que han sido manipulados mediante ingeniería genética para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición al antígeno. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena pesada y ligera humanas en cepas de ratón derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen una disrupción localizada en los loci de la cadena pesada y la cadena ligera endógenas. El ratón transgénico puede sintetizar anticuerpos humanos específicos de antígenos humanos, y este ratón puede utilizarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, en Green, L. L., *et al.*, *Nat. Genet.* 7 (1994) 13-21; Lonberg, N., *et al.*, *Nature* 65 368 (1994) 856-859; y Taylor, L. D., *et al.* *Int. Immun.* 6 (1994) 579-591.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse a partir de los cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen la cromatografía de afinidad con proteí-

na-A Sepharosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía por intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las págs. 2.7.1-2.7.12 y págs. 2.9.1-2.9.3; Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, págs. 79-104, The Humana Press, Inc., 1992).

5 Los anticuerpos pueden utilizarse en inmunoensayos de acuerdo con la invención. La detección puede realizarse poniendo en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, y luego poniendo en contacto la muestra biológica con una molécula marcada detectable, que se une al anticuerpo. El anticuerpo puede conjugarse con avidina/estreptavidina (o biotina) y la molécula marcada detectable puede comprender biotina (o avidina/estreptavidina). Los expertos en la materia conocen numerosas variaciones de esta técnica básica. Los marcajes detectables adecuados incluyen, por
10 ejemplo, un radioisótopo, un marcaje fluorescente, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje enzimático, un marcaje bioluminiscente u oro coloidal. Los expertos en la materia conocen los métodos para obtener y detectar tales inmunoconjugados marcados detectables y se describen con más detalle a continuación.

15 Los ejemplos siguientes, referencias, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a una mejor comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones anexas.

Descripción de las figuras

20 Figura 1 Expresión diferencial del mRNA de UKW en las líneas celulares de tumor pancreático SUIT-2 007 y SUIT-2 028 analizada mediante análisis de Northern blot.

(a: línea celular de tumor pancreático SUIT-2 007; b: línea celular de tumor pancreático SUIT-2 028)

25 Figura 2 Chip de expresión de múltiples tejidos (MTE™) (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Este chip contiene cargas normalizadas de RNA-Poli A⁺ de 76 tejidos diferentes además de RNA y DNA control, y permite un cribado de la presencia y abundancia relativa de un mRNA diana en un amplio espectro de tejidos fetales y adultos. H6 corresponde a 1 µg de RNA total de la línea celular de tumor pancreático SUIT-2 007. El código se expone a continuación.

30 Figura 3 Expresión relativa de RNA (Taqman®-PCR) en muestras derivadas de adenocarcinoma de páncreas (Pa-Ca), pancreatitis crónica (ChronPa) y en tejidos pancreáticos normales (NorPA).

35 Figura 4 Expresión relativa del mRNA de UKW en líneas celulares de tumores pancreáticos invasivos y no invasivos.

Figura 5 Expresión relativa del mRNA de UKW en líneas celulares de tumores mamarios invasivos y no invasivos.

Líneas celulares de tumores pancreáticos

Suit-2 007¹

40 MiaPaca-2, ATCC CRL 1420

AsPC1, ATCC CRL 1682

45 BxPC-3, ATCC CRL 1687

Capan-1, ATCC HTB79

50 IMIM-PC-1³

IMIM-PC-2³

55 Panc-1, ATCC CRL 1469

Suit-2 028¹

60 Capan-2, ATCC HTB80

Patu 8902²

65 Patu 8988s²

Patu 8988t²

ES 2 318 079 T3

Líneas celulares de tumores mamarios

BT-549, ATCC HTB122
5
Hs578T, ATCC HTB126
MCF-10A, ATCC CRL 10317
10
MCF-12A, ATCC CRL 10782
MDA-MB-436⁴
15
MDA-MB-231, ATCC 45518
MDA-MB-435, ATCC 45526
20
MDA-MB-157, ATCC HTB24
BT-20, ATCC HTB19
25
BT-483, ATCC HTB121
CAMA-1, ATCCHTB-21
30
Du4475, DSM ACC427
MCF-7, ATCC HTB22
35
MDA-MB-175, ATCC 45516
MDA-MB-361, ATCC HTB27
40
MDA-MB-453, DSM ACC65
SK-BR-3, ATCC 45520
45
T47D, ATCC HTB133
UCAA-812⁴
50
ZR-75-1, ATCC CRL 1500
ZR-75-30, ATCC CRL 1504

55 ¹ Taniguchi, S., et al., Clin. Exp. Metastasis 10 (1992)
259-266

60 ² Elsasser, H.P., et al., Virchows Arch. B Cell Pathol.
Incl. Mol. Pathol. 64 (1993) 201-207

³ Wenger, C., et al., Oncogene 18 (1999) 1073-1080

65 ⁴ Tong, D., et al., Breast Cancer Res. Treat. 56 (1999) 91-
97

ES 2 318 079 T3

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

5 *Northern blot*

Se cargaron 10 μg de RNA total de las líneas celulares SUIT-2 007 y SUIT-2 028 una al lado de la otra en un gel desnaturalizante de agarosa formaldehído al 1% y se separaron por tamaño mediante electroforesis. Se realizó una transferencia a la membrana de nailon cargada positivamente BrightStar-Plus™ mediante una transferencia por capilaridad descendente. Tras el entrecruzamiento por rayos UV (Stratagene UV Stratalinker 2400), se hibridó la transferencia. El producto de RT-PCR se marcó con α -[³²P]dATP hasta una actividad específica de 2×10^9 cpm/ μg utilizando el equipo Strip-EZ™ DNA Kit (Ambion Inc., Austin, Texas). La pre-hibridación (30 min.) y la hibridación (toda la noche) con la sonda radioactiva se realizó en la solución ExpressHyb™ Hibridization Solution (Clontech, Palo Alto, CA, USA) a 68°C. Se lavó la membrana en la solución 1 (2 x SSC, SDS al 0,05%) a temperatura ambiente durante 30-40 min. con agitación y varios reemplazos de la solución de lavado 1 seguido de un paso de lavado con la solución 2 (0,1 x SSC, SDS al 0,1%) a 50°C durante 40 min. con un cambio de solución nueva. Entonces se expuso la membrana a Cronex, películas de rayos X de uso en medicina (Sterling Diagnostic Imaging Inc., USA) a -70°C durante 2 h. Se valoró la igualdad de carga y la transferencia de mRNA a la membrana mediante la rehibridación de la transferencia con una sonda del cDNA de GAPDH marcado con α -[³²P]dATP.

20

Chip de expresión de múltiples tejidos (MTE™)

La transferencia se hibridó con una sonda marcada con α -[³²P]dATP derivada del cDNA de UKW de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se expuso a una película de rayos X a -70°C durante 62 h.

25

PCR Taqman®

Se realizaron PCR cuantitativas a tiempo real con la tecnología Taqman® y el aparato ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para las reacciones de transcriptasa reversa se utilizaron 10 μg de RNA total aislado a partir de adenocarcinomas de páncreas, pancreatitis crónica y tejidos pancreáticos normales congelados en un volumen de 20 μl . Entonces se llevaron a cabo las PCR mezclando 200 ng de cDNA con 4 μl de tampón de SYBR-Green 10x, MgCl₂ 3 mM, dNTP 1 mM, 0,2 unidades de N-uracil glicosilasa, 1 unidad de AmpliTaq Gold, 4 μl de mezcla de cebadores (300 nM de cada cebador: directo 5'TTCTCTTTGACAGGTTCTGGGC3' (Id. de Sec. N°: 3); reverso 5'GGTTGGAACCAGTAGGGCCTC3') (Id. de Sec. N°: 4) en un volumen final de 40 μl . Los cebadores de PCR se diseñaron para dar lugar a un fragmento de DNA de 50 pb utilizando el programa Primer Express (PE Biosystems, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron los siguientes: 2 min. a 50°C seguido de 10 min. a 95°C y 40 ciclos de amplificación (95°C durante 15 s. y 60°C durante 60 s.). Estos experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se calcularon mediante la sustracción del gen UKW de los niveles basales de RNA del gen de mantenimiento en cada muestra. Cada valor se dividió por el nivel basal promedio de mRNA de UKW de tres tejidos sanos. Las proporciones se elevaron al cuadrado y se calculó un valor recíproco.

40

45 *Cebadores*

xs13for: 5'AGATCCGCATGTCCCCTTC3' (Id. de Sec. N°: 5);

xs13rev: 5'CCTTGCGCATCATGGTGTT3' (Id. de Sec. N°: 6).

50

PCR LightCycler

La PCR LightCycler se realizó en un LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) en los capilares LightCycler utilizando una mezcla inicial disponible comercialmente que contiene la polimerasa de DNA Taq, SYBR-Green I, desoxiribonucleósidos trifosfato (LightCycler DNA master SYBR-Green I, Roche Molecular Biochemical). Tras la adición de los cebadores (directo 5'CCCAGGAGTTTATGCTTGG3' (Id. de Sec. N°: 7); reverso 5'GCCTGGATACCACACTACCAG3' (Id. de Sec. N°: 8); concentración final: 0,5 μM), el MgCl₂ (3 mM) y el molde de DNA a la mezcla inicial, se realizaron 37 ciclos de desnaturalización (95°C durante 1 s.), hibridación (58°C durante 5 s.) y extensión (72°C durante 8 s.). Todos las tasas de transición de temperatura se fijaron a 20°C por s. Tras la finalización de la amplificación de PCR, se realizó un análisis de la curva de fusión. Para este procedimiento, los productos de PCR se desnaturalizaron a 95°C, se hibridaron a 65°C, y se calentaron gradualmente hasta 95°C. La fluorescencia de SYBR-Green I se monitorizó continuamente cada 0,1°C. La curva de fusión se analizó mediante inspección visual y las estructuras reordenadas del gen UKW amplificado se fusionaron a 85-88°C. Para el control de la formación de dímeros de cebadores se incluyó un control sin DNA molde ("control agua") en cada experimento. Normalmente un pequeño pico es visible a 78°C, que puede diferenciarse del pico generado por el producto de amplificación específico a 85-88°C. La curva de calibración de la calnexina se generó utilizando diluciones seriadas (1:10, 1:50 y 1:80) del cDNA de la línea celular de cáncer pancreático Suit-2 007. Las cantidades relativas del cD-

65

ES 2 318 079 T3

NA de UKW y calnexina se determinaron en base a una curva de calibración. La expresión relativa del gen UKW se calculó como un valor normalizado generado dividiendo los niveles basales del gen UKW y la calnexina de cada muestra. Cebador directo de la calnexina 5'ATTGTCAGATCGTTCATTGC3' (Id. de Sec. N°: 9); cebador reverso 5'ATGGAACAGGTAACCAGCAT3' (Id. de Sec. N°: 10).

5

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos frente a polipéptidos de UKW

10

Para la inmunización, se sintetizaron los péptidos de los aa 167-182 y de los aa 306-320 (Id. de Sec. N°: 2) y se acoplaron a una molécula portadora. Se inmunizaron 2 conejos con la mezcla de péptidos.

Protocolo de inmunización estándar (para conejos)

Día 0: Extracción de un suero preinmune seguido de una primera inmunización.

Día 14: Segunda inmunización.

20

Día 28: Tercera inmunización.

Día 38: Extracción de sangre.

25

Día 56: Cuarta inmunización.

Día 66: Extracción de sangre.

30

Día 80: Extracción total de sangre.

El antisuero recuperado se purificó por cromatografía de afinidad.

Listado de referencias

35

Alves, F. et al., *Pancreas* 23 (2001) 227-235.

Ausubel I, Frederick M., *Current Protocols in Mol. Biol.* (1992), *John Wiley and Sons, New York.*

40

Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, págs. 79-104, *The Humana Press, Inc.*, 1992.

Büttner, R. et al., *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 3573-3583.

45

Coligan et al. (Ed.), *Current Protocols in Immunology*, págs. 9.3.1-9.3.5 y págs. 9.4.1-9.4.11 *John Wiley & Sons*, 1997.

Elsasser, H.P. et al., *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 64 (1993) 201-207.

50

EP-A 0 063 879

EP-A 0 128 018

EP-A 0 173 251

55

EP-A 0 200 362

Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición, *Mack Publishing Company*, 1995.

60

Gibson, J. B., y **Sobin, L. H.**, *Histological typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas*, *WHO, Geneva*, 1978.

Green, L. L. et al., *Nat. Genet* 7 (1994) 13-21.

65

Hames, B. D., **Higgins, S. G.**, *Nucleic Acid Hybridisation - A Practical Approach* (1985) *IRL Press, Oxford, England.*

Kroep, J. R. et al., *Ann. Oncol.* 10, Supl. 4 (1999) 234-238.

ES 2 318 079 T3

Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859.

Mole, “Epitope Mapping”, En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (Ed.), págs. 105-116, *The Humana Press, Inc., 1992.*

5

Morris (Ed.), *Epitope Mapping Protocols* 25, *Humane Press, Inc., 1996.*

Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies”, en: *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter y Ladyman (Ed.), págs. 60-84, *Cambridge University Press, 1995.*

10

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory. Manual* (1989) *Cold Spring harbour Laboratory Press, New York, USA.*

15

Shaper, N. L. et al., *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 3 (1998) 315-324.

Taniguchi, S. et al., *Clin. Exp. Metastasis* 10 (1992) 259-266.

Taylor, L. D. et al., *Int. Immun.* 6 (1994) 579-591.

20

Tong, D. et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 56 (1999) 91-97.

US 2.915.08Z

25

Wahl, G. M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3683-3687.

Warshau, A. L., y Fernandez, -del, C. C., *N. Engl. J. Med.* 326 (1992) 4555-4565.

Wenger, C. et al., *Oncogene* 18 (1999) 1073-1080.

30

WO 02/08288

WO 89/06698

35

Wu, Y. Y., y Rees, J. L., *Acta Derm. Venereol.* 80 (2000) 2-3.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar *in vitro* la presencia o ausencia de cáncer pancreático en un paciente, que comprende

(i) detectar en la muestra biológica de un paciente una cantidad de un polipéptido de Id. de Sec. N°: 2, y

(ii) comparar la cantidad de polipéptido con un valor estándar predeterminado indicando la línea de decisión entre presencia inducida por el tumor o no inducida por el tumor del polipéptido de Id. de Sec. N°: 2 en la célula, y a partir de ello determinar la presencia o ausencia de cáncer pancreático en el paciente, en el que la sobreexpresión es específica de células tumorales pancreáticas.

2. Un proceso para determinar *in vitro* si la muestra de tejido o fluido de un paciente contiene o no células tumorales pancreáticas o deriva de células tumorales pancreáticas, en el que se utilizan una muestra de prueba y una segunda muestra originada a partir de células no tumorales pancreáticas del mismo individuo o de un individuo diferente de la misma especie, cuyo proceso comprende los siguientes pasos:

(a) incubar cada muestra respectiva bajo condiciones de hibridación restrictivas con una sonda de ácido nucleico que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

(i) una secuencia de ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1, o un fragmento de la misma;

(ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de ácido nucleico de (i);

(iii) una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones astringentes con la secuencia de (i); y

(iv) una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones astringentes con la secuencia de (ii); y

(b) determinar la cantidad aproximada de hibridación de cada muestra respectiva con dicha sonda, y

(c) comparar la cantidad aproximada de hibridación de la muestra de prueba con la cantidad aproximada de dicha segunda muestra para identificar si la muestra de prueba contiene o no una mayor cantidad de ácido nucleico o mezcla de ácidos nucleicos específicos que dicha segunda muestra.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que se **caracteriza** porque

a) dicha muestra se selecciona del grupo de fluidos corporales o células, o de un extracto celular o el sobrenadante del cultivo celular de dichas células,

b) dicha determinación de la hibridación se realiza mediante otra pareja de unión del ácido nucleico de la muestra y/o la sonda de ácido nucleico o por exposición a una película de rayos X.

4. Un método de cribado para identificar *in vitro* un compuesto que inhibe la actividad biológica del polipéptido de Id. de Sec. N°: 2, lo que comprende:

poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto o una variedad de compuestos bajo condiciones que permiten la interacción de dicho compuesto con dicho polipéptido; y

detectar la interacción entre dicho compuesto o variedad de compuestos con dicho polipéptido.

5. Un método de cribado para identificar *in vitro* un compuesto que inhibe la actividad biológica del polipéptido de Id. de Sec. N°: 2 o inhibe la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica un polipéptido de Id. de Sec. N°: 2, lo que comprende:

poner en contacto dicho compuesto o variedad de compuestos con una célula huésped en la que la capacidad invasiva está mediada por la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Id. de Sec. N°: 2, y

detectar la interacción entre dicho compuesto o variedad de compuestos con dicha célula huésped.

6. El método de cribado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la detección de la interacción entre dicho compuesto o variedad de compuestos con dicha célula huésped se mide mediante al menos un cambio en la fisiología celular, un cambio en el estado de diferenciación o un cambio en el metabolismo celular que conduce a un aumento de la proliferación.

7. Un método de cribado para la identificación *in vitro* de un compuesto que es un antagonista de un polipéptido de Id. de Sec. N°: 2, lo que comprende:

ES 2 318 079 T3

poner en contacto dicho polipéptido de Id. de Sec. N°: 2 con un compuesto bajo condiciones que permitan la interacción de dicho compuesto con dicho polipéptido;

determinar un primer nivel de actividad de dicho polipéptido;

5

determinar un segundo nivel de actividad de dicho polipéptido expresado en un huésped que no ha sido puesto en contacto con dichos compuestos; y

10

relacionar cuantitativamente el primer nivel de actividad con el segundo nivel de actividad, y cuando dicho primer nivel de actividad es menor que dicho segundo nivel de actividad, dicho compuesto se identifica como un antagonista de dicho polipéptido.

8. Un anticuerpo dirigido frente a los aa 167-182 o aa 306-320 del polipéptido UKW de Id. de Sec. N°: 2.

15

9. Un equipo para el diagnóstico de un tumor pancreático que comprende el anticuerpo de la reivindicación 8.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

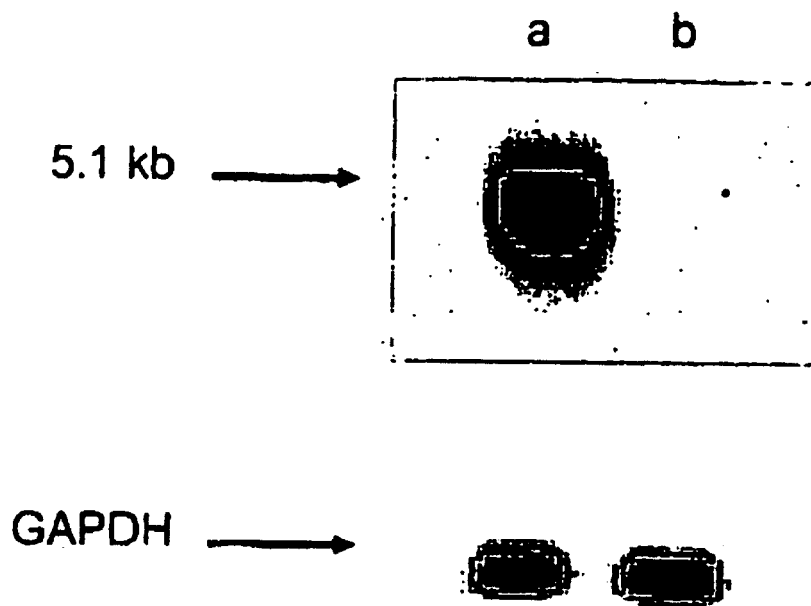
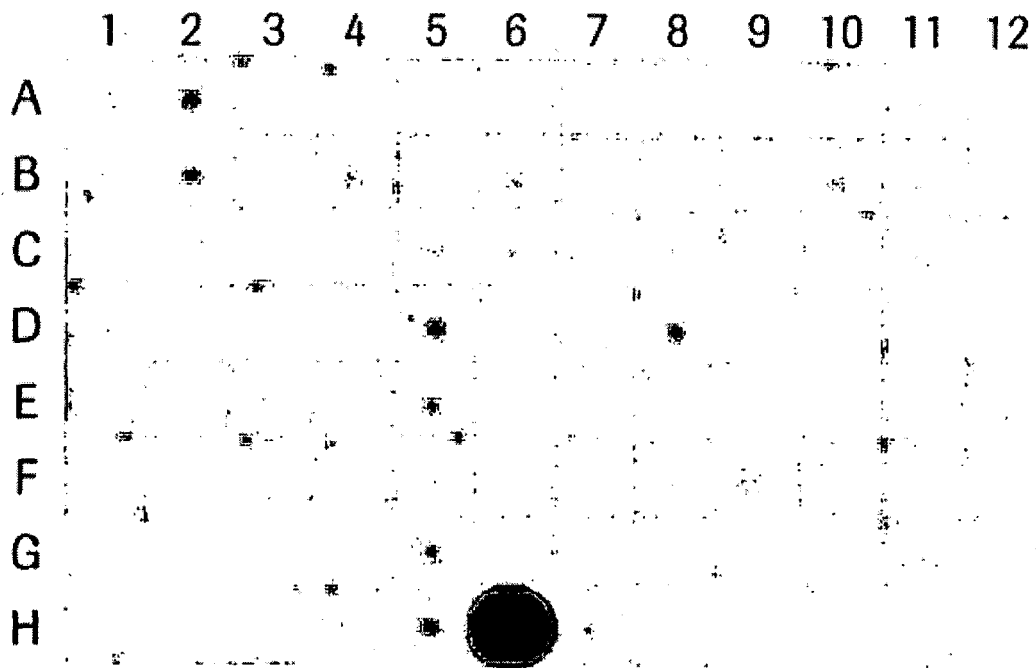


Fig. 2



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	cerebro entero	cerebelo izquierdo	sustancia nigra	corazón	esófago	colon, transverso	riñón	pulmón	hígado	leucemia HL-60	cerebro fetal	rRNA total de levadura
B	córtex cerebral	cerebelo derecho	núcleo accumbens	aorta	estómago	colon descendente	músculo esquelético	placenta	páncreas	HeLa S3	corazón fetal	tRNA de levadura
C	lóbulo frontal	cuerno calloso	tálamo	aurícula izquierda	duodeno	recto	bazo	vejiga	glándula adrenal	leucemia K562	riñón fetal	rRNA de E. coli
D	lóbulo parietal	amígdala	glándula pituitaria	aurícula derecha	yeyuno		timo	útero	glándula tiroide	leucemia MOLT-4	hígado fetal	DNA de E. coli
E	lóbulo occipital	núcleo caudado	médula espinal	ventrículo izquierdo	ileo		leucocitos sangre periférica	próstata	glándula salival	línea de Burkitt Raji	bazo fetal	Holi r(A)
F	lóbulo temporal	hipocampo		ventrículo derecho	ileociego		nódulo linfático	testículos	glándula mamaria	linfoma de Burkitt Daudi	timo fetal	DNA Cot-1 humano
G	g. p.º de córtex cerebral	médula oblongata		septo inter-ventricular	apéndice		médula ósea	ovario		adenocarcinoma colorectal SW620	pulmón fetal	100 ng de DNA humano
H	pons	putamen		ápice del corazón	colon, ascendente			tráquea		carcinoma pulmonar A549		500 ng de DNA humano

*giro paracentral

Fig. 3

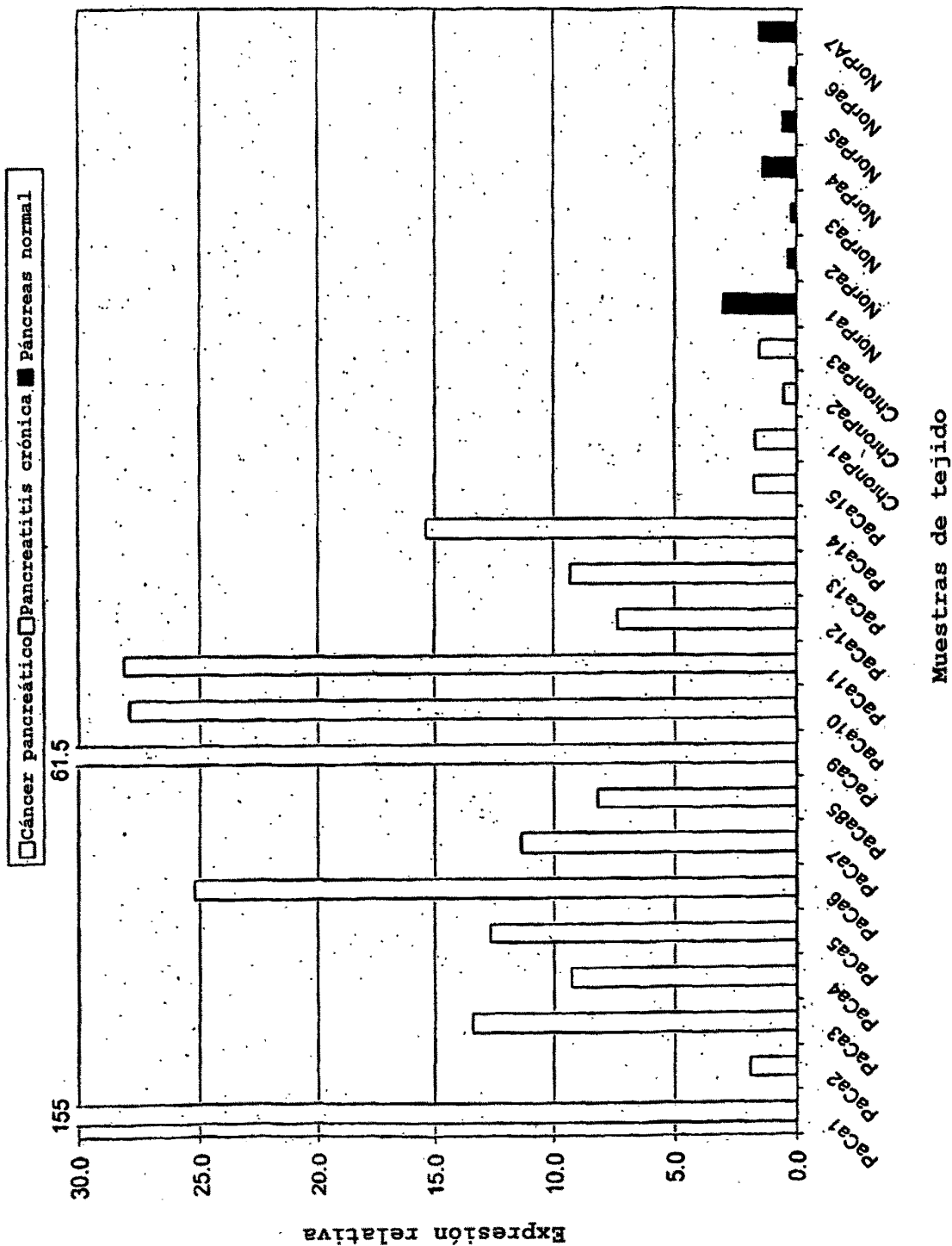
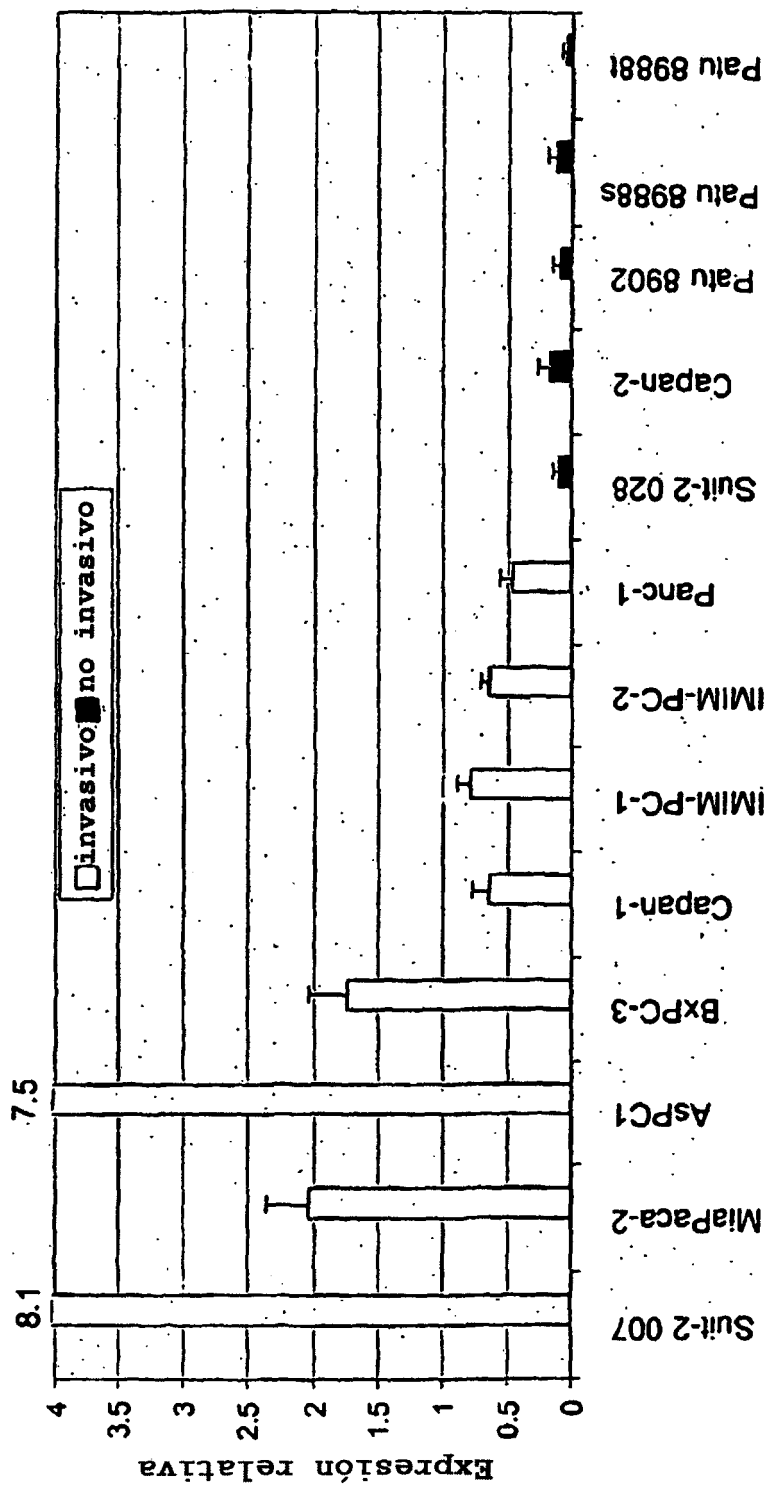
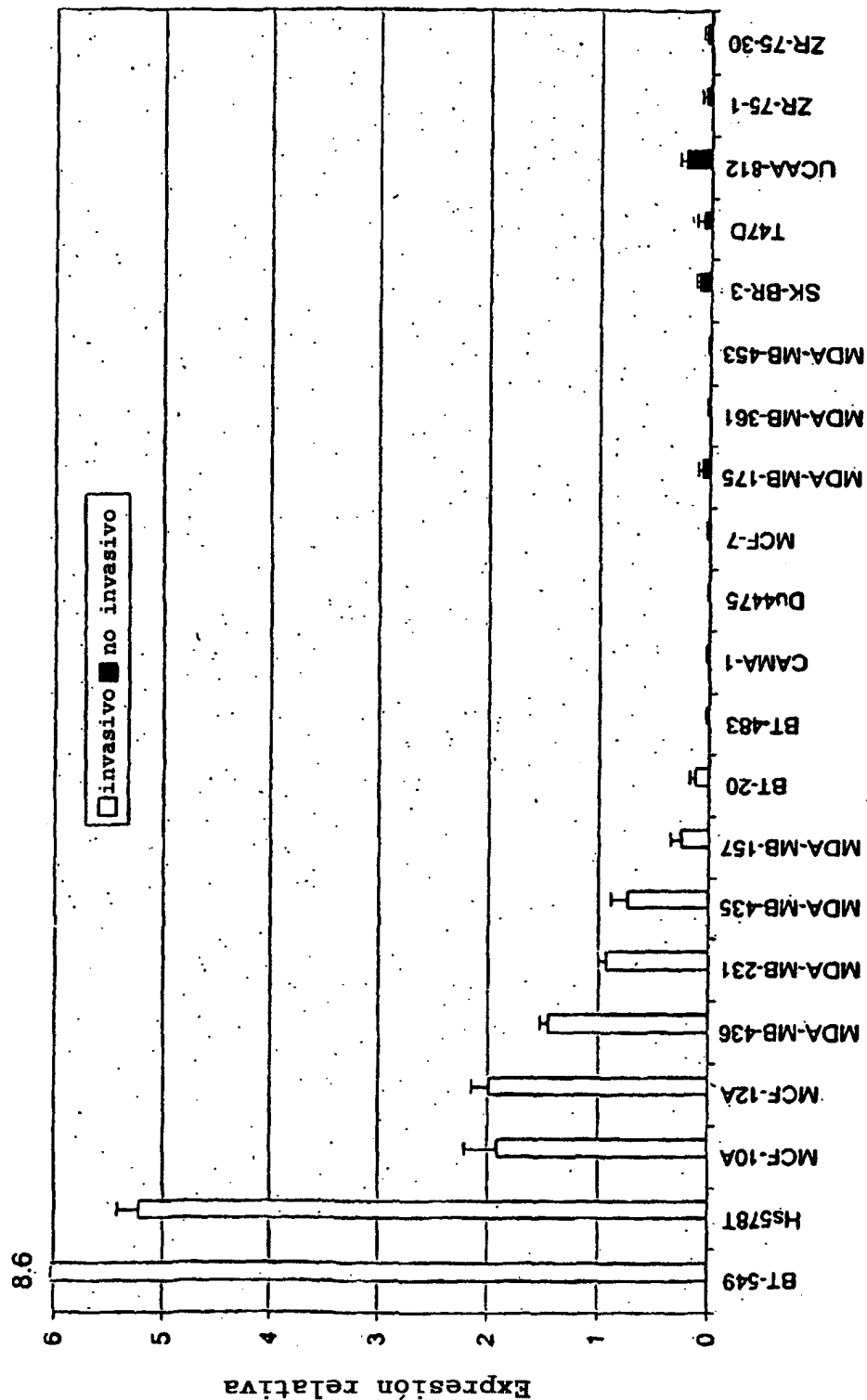


Fig. 4



Líneas celulares de tumores pancreáticos

Fig. 5



Líneas celulares de tumores mamarios

ES 2 318 079 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Métodos para el diagnóstico y la terapia de cáncer pancreático y composiciones útiles en los mismos

<130> 21460

<140>

<141>

<150> PE 02024539.5

<151> 2002-10-31

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5120

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (366)...(1484)

<400> 1

```
30      ggtaggaggc aaccatgtgg ttcagctga atttttttt tccctctctc tttcttcaact 60
      cctttttctt tccaaacagg gaaaagtgtt ccacgaagcg gttagcctct tccgcctcgc 120
35      gttttctctc ctgaccctgg tcccggctcc cgtccggggc ccagctggtg gggcgagcgc 180
      cgggagccca tctgccccca ggggcacggg gcgcgggggc ggtccccgcc cggcacatgg 240
40      ctgcagccac ctgcgcgcga ccccgaggcg ccgcgccag ctgccccgag gtccgtcggga 300
      ggcgccccgc cgccccggag ccaagcagca gctgagcggg gaagcgcctg cgtccgggga 360
45      tcggg atg tcc ctc ctc ctt ctc ctc ttg cta gtt tcc tac tat gtt gga 410
      Met Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ser Tyr Tyr Val Gly
      1       5       10      15
50      acc ttg ggg act cac act gag atc aag aga gtg gca gag gaa aag gtc 458
      Thr Leu Gly Thr His Thr Glu Ile Lys Arg Val Ala Glu Glu Lys Val
      20      25      30
55      act ttg ccc tgc cac cat caa ctg ggg ctt cca gaa aaa gac act ctg 506
      Thr Leu Pro Cys His His Gln Leu Gly Leu Pro Glu Lys Asp Thr Leu
      35      40      45
60      gat att gaa tgg ctg ctc acc gat aat gaa ggg aac caa aaa gtg gtg 554
      Asp Ile Glu Trp Leu Leu Thr Asp Asn Glu Gly Asn Gln Lys Val Val
      50      55      60
```

ES 2 318 079 T3

atc act tac tcc agt cgt cat gtc tac aat aac ttg act gag gaa cag 602
 Ile Thr Tyr Ser Ser Arg His Val Tyr Asn Asn Leu Thr Glu Glu Gln
 65 70 75
 5
 aag ggc cga gtg gcc ttt gct tcc aat ttc ctg gca gga gat gcc tcc 650
 Lys Gly Arg Val Ala Phe Ala Ser Asn Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ser
 80 85 90 95
 10
 ttg cag att gaa cct ctg aag ccc agt gat gag ggc cgg tac acc tgt 698
 Leu Gln Ile Glu Pro Leu Lys Pro Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Thr Cys
 100 105 110
 15
 aag gtt aag aat tca ggg cgc tac gtg tgg agc cat gtc atc tta aaa 746
 Lys Val Lys Asn Ser Gly Arg Tyr Val Trp Ser His Val Ile Leu Lys
 115 120 125
 20
 gtc tta gtg aga cca tcc aag ccc aag tgt gag ttg gaa gga gag ctg 794
 Val Leu Val Arg Pro Ser Lys Pro Lys Cys Glu Leu Glu Gly Glu Leu
 130 135 140
 25
 aca gaa gga agt gac ctg act ttg cag tgt gag tca tcc tct ggc aca 842
 Thr Glu Gly Ser Asp Leu Thr Leu Gln Cys Glu Ser Ser Ser Gly Thr
 145 150 155
 30
 gag ccc att gtg tat tac tgg cag cga atc cga gag aaa gag gga gag 890
 Glu Pro Ile Val Tyr Tyr Trp Gln Arg Ile Arg Glu Lys Glu Gly Glu
 160 165 170 175
 35
 gat gaa cgt ctg cct ccc aaa tct agg att gac tac aac cac cct gga 938
 Asp Glu Arg Leu Pro Pro Lys Ser Arg Ile Asp Tyr Asn His Pro Gly
 180 185 190
 40
 cga gtt ctg ctg cag aat ctt acc atg tcc tac tct gga ctg tac cag 986
 Arg Val Leu Leu Gln Asn Leu Thr Met Ser Tyr Ser Gly Leu Tyr Gln
 195 200 205
 45
 tgc aca gca ggc aac gaa gct ggg aag gaa agc tgt gtg gtg cga gta 1034
 Cys Thr Ala Gly Asn Glu Ala Gly Lys Glu Ser Cys Val Val Arg Val
 210 215 220
 50
 act gta cag tat gta caa agc atc ggc atg gtt gca gga gca gtg aca 1082
 Thr Val Gln Tyr Val Gln Ser Ile Gly Met Val Ala Gly Ala Val Thr
 225 230 235
 55
 ggc ata gtg gct gga gcc ctg ctg att ttc ctc ttg gtg tgg ctg cta 1130
 Gly Ile Val Ala Gly Ala Leu Leu Ile Phe Leu Leu Val Trp Leu Leu
 240 245 250 255
 60
 atc cga agg aaa gac aaa gaa aga tat gag gaa gaa gag aga cct aat 1178
 Ile Arg Arg Lys Asp Lys Glu Arg Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Pro Asn
 260 265 270
 65
 gaa att cga gaa gat gct gaa gct cca aaa gcc cgt ctt gtg aaa ccc 1226
 Glu Ile Arg Glu Asp Ala Glu Ala Pro Lys Ala Arg Leu Val Lys Pro
 275 280 285

ES 2 318 079 T3

5 age tcc tct tcc tca ggc tct cgg agc tca cgc tct ggt tct tcc tcc 1274
 Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser
 290 295 300
 10 act cgc tcc aca gca aat agt gcc tca cgc agc cag cgg aca ctg tca 1322
 Thr Arg Ser Thr Ala Asn Ser Ala Ser Arg Ser Gln Arg Thr Leu Ser
 305 310 315
 15 act gac gca gca ccc cag cca ggg ctg gcc acc cag gca tac agc cta 1370
 Thr Asp Ala Ala Pro Gln Pro Gly Leu Ala Thr Gln Ala Tyr Ser Leu
 320 325 330 335
 20 gtg ggg cca gag gtg aga ggt tct gaa cca aag aaa gtc cac cat gct 1418
 Val Gly Pro Glu Val Arg Gly Ser Glu Pro Lys Lys Val His His Ala
 340 345 350
 25 aat ctg acc aaa gca gaa acc aca ccc agc atg atc ccc agc cag agc 1466
 Asn Leu Thr Lys Ala Glu Thr Thr Pro Ser Met Ile Pro Ser Gln Ser
 355 360 365
 30 aga gcc ttc caa acg gtc tgaattacaa tggacttgac tcccacgctt 1514
 Arg Ala Phe Gln Thr Val
 370
 35 tcctaggagt cagggctctt ggactcttct cgtcattgga gctcaagtca ccagccacac 1574
 40 aaccagatga gaggtcatct aagtagcagt gagcattgca cggaacagat tcagatgagc 1634
 atcttctta tacaatacca aacaagcaaa aggatgtaag ctgattcatc tgtaaaaagg 1694
 45 catcttattg tgcctttaga ccagagtaag ggaaagcagg agtccaaatc tatttgttga 1754
 ccaggacctg tggtgagaag gttggggaaa ggtgaggatga atatacctaa aacttttaat 1814
 50 gtgggatatt ttgtatcagt gctttgatc acaattttca agaggaaatg ggatgctggt 1874
 tgtaaatttt ctatgcattt ctgcaaactt attggattat tagttattca gacagtcaag 1934
 55 cagaaccac agccttatta cacctgtcta caccatgtac tgagctaacc acttctaaga 1994
 aactcaaaa aaggaaacat gtgtcttcta ttctgactta acttcatttg tcataagggt 2054
 60 tggatattaa tttcaagggg agttgaaata gtgggagatg gagaagagtg aatgagtttc 2114
 tcccactcta tactaatctc actatttcta ttgagcccaa aataactatg aaaggagaca 2174
 aaaatttggt acaaaggatt gtgaagagct ttccatcttc atgatgttat gaggattggt 2234
 65 gacaaacatt agaaatatat aatggagcaa ttgtggattt cccctcaaat cagatgcctc 2294
 taaggacttt cctgctagat atttctggaa ggagaaaata caacatgtca tttatcaacg 2354
 tccttagaaa gaattcttct agagaaaaag ggatctagga atgctgaaag attaccaaac 2414
 ataccattat agtctcttct ttctgagaaa atgtgaaacc agaattgcaa gactgggtgg 2474

ES 2 318 079 T3

actagaaagg gagattagat cagttttctc ttaatatgtc aaggaaggta gccgggcatg 2534
 gtgccaggca cctgtaggaa aatccagcag gtggagggtg cagtgagcca agattatgcc 2594
 5 attgcactcc agcctgggtg acaaaagcaag actccatctc aaaaaaaaaa aaaaatcaag 2654
 gaaggataaa aggaagttca gtattgtacc acacttggaa cttcctccat ttcttccatt 2714
 10 ttagaaggat atgaacctgg aacttttgat gattctaagc cttaaactat caaaaagatc 2774
 agggattgcc aatgcttcta atggcactgc aagtatatgc cataaccgtt ccctcctaaa 2834
 15 agtgaaaaat gagagaaatt cagtattttc ccaggctcag catccagaag tctagctctg 2894
 ggctggaaga aaagggtact aatatttagg gaagagatga gaataagtag tgggtggcag 2954
 20 gagagggctg agctagtgcc tgctaacatt ttagttgtat cttggaaaga tttagcaaaa 3014
 ataactcacc aggatagctg ctgaagagtt gatgaatggg agaagaaaga tgtttgagaa 3074
 25 ataaagaaaa cagcagcctg caatacaata acttgccttt ttaatagttt tgattactct 3134
 tgatacctac agcacaaatg ctggacctga atcagctctt caaggacctt agcacaaatg 3194
 30 tcaactgac acctctggga gagtagaaaa cttttttttt tttgagacga agtctcgtc 3254
 tgttgcccag gctggagtgc agtggcacca tctcagctca ctgcagcgtc cgctcttgg 3314
 gttcaagtga ttctctgcc ttgtctctct gagtcgctgg tattacaggt gcctgccatc 3374
 35 acaccagct aatttttgga gttctgatag agacagggtt tctccatggt ggccaggctt 3434
 gtctcaagct cctgacctca agtgacctac ccaccttgg cctcccacag tgctggaagc 3494
 40 cactgcacct ggctcagaat actttttttt ttgagatgca gtcttgctct catcacgcag 3554
 gctggagtgc agtggcgtat ctgggtcac tggacctcc acctcccag ttcaagcgat 3614
 45 tctcttctc cagtcccca agtagcttgg attataggtg tgcgccacca cgtacagcta 3674
 atttttgtat ttttagtaga gatggggtt cgccatgtt accaggctgg tctcaaaacg 3734
 50 cctgacctca ggtgatccac ccacctcggc cccacaaagt gctaggatta caggtgtgag 3794
 ccacatgcc cggcccagaa tactttttaa aagaagagca ggtagagga aagaaaaaaa 3854
 55 ttgatgctga atgtggtgat gaaagcatgt ttctaaaatg ggaagcagat gcttaaagag 3914
 gaaagactaa tctgggattt tgccccattt ctctggttt tcaactctat atttaattct 3974
 60 cacaatcgtg tcgtcacata gtgcaaaaa caaattctt gtaaagtccc caggagtta 4034
 tgcttgggtg aaagttttag cctgagtatt ttcttctct aaaaaagggt ggaaatgaga 4094
 65 cattgaggaa ttaacatata aatgtctgct atgggttaa gagaactggc gtatttggaa 4154

ES 2 318 079 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

tgcttcttac actaacactg tctcattgta aatatataaa ccccttactc taactacatt 4214
 tttattcctc tggtagtggt gtatccaggc aacatatcac ttctgctatg taattctaag 4274
 aattctcatt tctagagtac ctgagccaâa caaatacaca acggaagctg cagctgtatc 4334
 atcactagca atttgctcat cattatttac tacctttgaa cctaaggttt cctgcctatg 4394
 cttttgaaag caaaaatcag tctcctttgc atgaaaaaga gccttagatt tttaaacatg 4454
 ttagttacca gaatgctaaa ataccagttg attacccaaa ttattttgga aatctatcca 4514
 taatggaagt ctacaacaaa cacataaaac agattacact aagagctgag aaattcaaag 4574
 gaactgaaga ttctgagaga taaactgttc aagtcttagc aatgatactg cacttctctt 4634
 tgacaggttc tgggcttaag ttagaggccc tactggttcc aaaccatatt cactgactt 4694
 tgcaagtaaa ataaatttga ttctgaaata ggaaacaaaa aaaggagaaa taaccgaata 4754
 gtagaagaaa aactgtttgt aggaagacga tgcagatgga atgatgtgga cattgagtaa 4814
 ccatgtcaat aaaatatata aaccaaactt aaatttgtga aataaggaag ttggtacctt 4874
 tgttgttaca gtgtataaaa acaatttcggt aactgctgtt gcaaaaagac atatatagtt 4934
 ttgcttcctt ctgggtgtaa gctgtttata tttcagtttc agttttaact tctaagttgc 4994
 cttgtaattg ggactgtgtt tcagcatcac aaaaaccaaâ tatttattat ggatgcatct 5054
 gtatcagcaa ttaaaaaata aacaagtaaa agtgatactg taggagaagc tgaagctcaa 5114
 aaaaaa 5120

40 <210> 2
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 2

50 Met Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ser Tyr Tyr Val Gly Thr
 1 5 10 15
 55 Leu Gly Thr His Thr Glu Ile Lys Arg Val Ala Glu Glu Lys Val Thr
 20 25 30
 Leu Pro Cys His His Gln Leu Gly Leu Pro Glu Lys Asp Thr Leu Asp
 35 40 45
 60 Ile Glu Trp Leu Leu Thr Asp Asn Glu Gly Asn Gln Lys Val Val Ile
 50 55 60
 65 Thr Tyr Ser Ser Arg His Val Tyr Asn Asn Leu Thr Glu Glu Gln Lys
 65 70 75 80

ES 2 318 079 T3

Gly Arg Val Ala Phe Ala Ser Asn Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 5 Gln Ile Glu Pro Leu Lys Pro Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Thr Cys Lys
 100 105 110
 10 Val Lys Asn Ser Gly Arg Tyr Val Trp Ser His Val Ile Leu Lys Val
 115 120 125
 15 Leu Val Arg Pro Ser Lys Pro Lys Cys Glu Leu Glu Gly Glu Leu Thr
 130 135 140
 20 Glu Gly Ser Asp Leu Thr Leu Gln Cys Glu Ser Ser Ser Gly Thr Glu
 145 150 155 160
 25 Pro Ile Val Tyr Tyr Trp Gln Arg Ile Arg Glu Lys Glu Gly Glu Asp
 165 170 175
 30 Glu Arg Leu Pro Pro Lys Ser Arg Ile Asp Tyr Asn His Pro Gly Arg
 180 185 190
 35 Val Leu Leu Gln Asn Leu Thr Met Ser Tyr Ser Gly Leu Tyr Gln Cys
 195 200 205
 40 Thr Ala Gly Asn Glu Ala Gly Lys Glu Ser Cys Val Val Arg Val Thr
 210 215 220
 45 Val Gln Tyr Val Gln Ser Ile Gly Met Val Ala Gly Ala Val Thr Gly
 225 230 235 240
 50 Ile Val Ala Gly Ala Leu Leu Ile Phe Leu Leu Val Trp Leu Leu Ile
 245 250 255
 55 Arg Arg Lys Asp Lys Glu Arg Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Pro Asn Glu
 260 265 270
 60 Ile Arg Glu Asp Ala Glu Ala Pro Lys Ala Arg Leu Val Lys Pro Ser
 275 280 285
 65 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Thr
 290 295 300
 70 Arg Ser Thr Ala Asn Ser Ala Ser Arg Ser Gln Arg Thr Leu Ser Thr
 305 310 315 320
 75 Asp Ala Ala Pro Gln Pro Gly Leu Ala Thr Gln Ala Tyr Ser Leu Val
 325 330 335
 80 Gly Pro Glu Val Arg Gly Ser Glu Pro Lys Lys Val His His Ala Asn
 340 345 350
 85 Leu Thr Lys Ala Glu Thr Thr Pro Ser Met Ile Pro Ser Gln Ser Arg
 355 360 365
 90 Ala Phe Gln Thr Val
 370

ES 2 318 079 T3

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador directo

10 <400> 3

ttctctttga caggttctgg gc 22

15

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador reverso

25 <400> 4

ggttggaacc agtagggcct c 21

30

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

35 <213> Secuencia Artificial.

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador xs13 directo

40

<400> 5

agatccgcat gtcccttc 18

45

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador xs13 reverso

55

<400> 6

ccttgcgcat catggtggt 19

60

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 318 079 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia: cebador directo

5 <400> 7

ccccaggagt ttatgcttgg 20

10 <210> 8

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador reverso

20 <400> 8

gcctggatac cacactacca g 21

25 <210> 9

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador directo

35 <400> 9

attgtcagat cgttcattgc 20

40 <210> 10

<211> 20

<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador reverso

50 <400> 10

atggaacagg taaccagcat 20

55

60

65